



TITLE:

蛍光抗原法 : 腸管における抗アデノウイルス抗体保有細胞の観察

AUTHOR(S):

児玉, 宏

CITATION:

児玉, 宏. 蛍光抗原法 : 腸管における抗アデノウイルス抗体保有細胞の観察. 日本外科宝函 1975, 44(2): 124-140

ISSUE DATE:

1975-03-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/208061>

RIGHT:

蛍 光 抗 原 法

——腸管における抗アデノウイルス抗体保有細胞の観察——

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：日笠頼則教授）

児 玉 宏

〔原稿受付：昭和50年1月18日〕

Fluorescent Antigen Technique: A Method of the Histochemical Demonstration of Anti-adenovirus Antibody Containing Cells

HIROSHI KODAMA

The 2nd Surgical Department, Kyoto University Medical School
(Director: Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

In order to study the pathogenesis of appendicitis and infantile intussusception, a method, "fluorescent antigen technique" was developed for locating the anti-adenovirus antibody containing cells in tissues.

Soluble A antigen of adenovirus, which was produced in the course of multiplication of the virus and a major component of the virion, was purified by chromatography on DEAE-cellulose columns and was labelled with FITC. Paraffin embedded sections of human intestine surgically removed and of mice inoculated with murine adenovirus were stained with the FITC-labelled adenovirus antigen and were studied under fluorescent microscope.

Specific adenovirus antibody could be demonstrated clearly in the plasma cells of the human intestine as well as adenovirus-infected mouse intestine and mesenteric lymphnodes.

Although this fluorescent antigen technique is applied only to adenovirus at present, it is very convenient and specific for study of adenovirus infection and the antibody production.

緒 言

1965年、戸部¹⁾は虫垂炎の成因の一つとしてウイルス感染をあげ、特にその際の虫垂壁リンパ組織の増殖が、虫垂炎への進展に大きく関与していることを報告

し、国内外に大きな反響を呼んだ²⁾³⁾。それ以後、われわれは従来成因の明らかでなかった腹部外科領域の疾患で特に組織学的にリンパ組織の増生が著明である疾患群、すなわち虫垂炎をはじめ小児腸重積症、腸間膜リンパ節炎等の成因に関する研究を重ね、サルとマ

Key words: fluorescent antigen technique, adenovirus, infantile intussusception,
Present address: The 2nd Surgical Department, Kyoto University Medical School, Sakyo-ku,
Kyoto, Japan

ウスにおける感染実験および臨床例についてを検討することによって、ウイルス特にアデノウイルス群の感染がそれら疾患群（筆者は仮に、abdominal lymphadenopathy という名で包括してもよいと考えている）の成因の1つとして与っていることを明らかにしてきた^{4)~10)}。

マウスにおけるアデノウイルス感染実験において、われわれはこのようなリンパ組織の増生がアデノウイルス感染の結果によるもので、而もそれが生体側の防禦機構の1つとして惹起されるものではあるが、それらの疾患が成立して、臨床医が取扱う時期には、最早その原因であるウイルス自体は、既に姿を消してしまっていることをも実験的に明かならしめ得た。従って、臨床例において得られた虫垂や腸間膜リンパ節からウイルス分離を試みても、また螢光抗体法でウイルス抗原を証明しようとしても、そのような従来の方法ではそれら疾患がウイルス感染にもとづくものであることを証明することはもとより出来ない。現に、われわれの集積した虫垂炎患者の虫垂からのアデノウイルス分離率は必ずしも高くないし、小児腸重積症においても、アデノウイルスを分離し得たものや、螢光抗体法でそのような事実を証明し得たものは約半数に過ぎない⁸⁾。このような理由から、増生したリンパ組織がウイルス感染の結果によるものであることを組織学的に証明するためには、そこに存在する細胞の多くがウイルスに対する特異抗体を盛んに産生している事実を立証しなければならない。

こうした動機から、アデノウイルスの可溶性抗原を精製し、これを螢光色素である FITC で標識し、いわば従来から行われてきた螢光抗体法の逆を行って、組織切片上のアデノウイルスに対する特異抗体を螢光顕微鏡下に観察し得るようにしようと意図したわけである。この螢光抗原法ともいふべき手技は、組織上の抗体の所在を検索する方法として従来用いられてきた螢光抗体法によるサンドウィッチ^{11)~13)} 法や、オートラジオグラフィーによる方法^{14)~16)} に比して、極めて特異性が高く、また比較的容易に行えるなど、抗原の性状や適用条件次第では、さらに広い応用域が秘められているように思われる（図1）。

本 法 の 原 理

アデノウイルスは、その増殖は、その増殖過程において A, B, C の名称のもとに取り扱われている可溶性抗原を産生する^{17)~18)}。現在アデノウイルスはヒト

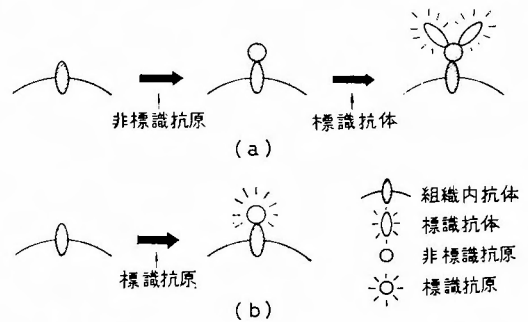


図 1 組織切片上における抗体の所在の検出。
 (a)は従来から用いられている螢光抗体法を応用したサンドウィッチ法¹¹⁾
 (b)は螢光抗原法

由来の31型のほか、サル、マウス等に由来するものをも含めると51型にも及ぶ。ところで、可溶性抗原中、A 抗原と呼ばれるものは、そのようなウイルス粒子の表面を構成しているヘクソン粒子で、全てのアデノウイルスに共通した抗原性を有する²⁰⁾。而も、このA 抗原は可溶性抗原のうちで最も多く産生され、感染時の免疫反応を誘導する最も強力な抗原性を有するものとされている。またA 抗原は、DEAE セルロースのカラムクロマトグラフィーにより比較的容易に分離、精製され^{21)~23)}その大部分のものが分子量約210,000の蛋白から成り²⁴⁾²⁵⁾、現在ではそのアミノ酸構成もかなり克明にされている^{26)~29)}。

こうした点から、螢光抗体法においては螢光色素をγ-グロブリンに標識するが³⁰⁾³¹⁾、それに習って、A 抗原のアミノ基（主にリジンε-アミノ基）に-FITC（フローレセシンイソチオシアネート）の-NCS 基を反応させてチオカーバマイド結合を惹起せしめれば、そこに、FITC 標識アデノウイルスA 抗原を作製し得るように思われるし、それが得られるようであれば、この標識A 抗原を切片上において組織内抗アデノウイルス抗体と反応させることによって螢光顕微鏡下に、抗体の存在部分に特異螢光を立証することも可能ならしめ得るものと考えた（図1）。これは丁度、螢光抗体法の逆になる。このような原理は当然誰しもが一旦は考えるもので、螢光抗体法の創始者である Coons 自身もそれを試みた形跡があり¹¹⁾、その後もその可能性を指摘したものがみられる。併し、その際用いられた抗原の性状、精製などに難点があったためか、筆者の知るかぎりでは今日までのところそれに成功したとの報告をみない。ただ、螢光抗体法における標識γ-グロブリンを用いて、抗γ-グロブリン抗体の所在を検索す

ることは以前から行われており、これを抗原法と称している場合もあるが、ここに報告する螢光抗原法は螢光色素標識過程の点からみてそれとは全く異なるものである。

実験材料と方法

I. 螢光抗原液の作成

アデノウイルスとしては、京都大学ウイルス研究所保存の12型 (Huie 株) を用いた。

A 抗原は群共通性を有するため、何型由来のもでもよい。しかし、特に12型を選んだ理由は、ウイルス増殖が比較的容易で、而も A 抗原を精製する際の DEAE-セルロースカラムクロストグラフィーの施行に際して、他型の場合とは異なり A 抗原がまず最初に溶出してくるため、いわゆる tailing effect による他抗原混入の恐れが可及的避け得るからである。

(1) ウイルスの増殖

Eagleによりヒト口底癌より樹立され、京都大学ウイルス研究所で継代培養されている KB細胞³⁴⁾を仔ウシ血清1%加Eagle基礎培地 (MEM)²⁵⁾下で単層培養したのち、上述のアデノウイルスを接種した。接種は、それまでの培養液を捨てたのち、ルー瓶1本につきストック・ウイルス1ml液を室温にて60分間吸着させることによって行い、その後、仔ウシ血清1%加Eagle-MEMを加えて37°C下に培養をはじめ、72時間後、アデノウイルスに特異的な細胞変性効果 (CPE) が顕微鏡下に一様に認められるに至ったところで、培養ビンのガラス壁に付着している細胞を rubber policeman でこすり落して、ルー瓶1本につき2mlのウイルス感染細胞浮遊液を作成し、-20°C下に保存した。

(2) ウィルス液の精製

上述の方法で集めたアデノウイルス感染KB細胞浮遊液50mlを、5回凍結、融解を繰返して行うことによって感染細胞の細胞膜および核膜を破壊、ウイルスを感染細胞から溶出せしめ、これを5,000r.p.m.で10分間遠沈し、その上清を集めて粗ウイルス液とした。

次いで、Gesslerの方法³⁶⁾に従って、フロロカーボン処理を行い、リボ蛋白を除去した。すなわち、上記の粗ウイルス液に等量のフロロカーボン (dichlorodifluoroethane) を加え、ホセジナイザーで1分間混和したのち、2,000r.p.m.で5分間遠沈、水層とフロロカーボン層に分離、水層部分のみを採り、同じ操作を3回

繰返した。この操作によってもウイルス液の損失は殆んどみられなかった。こうして得られた精製ウイルス液のうちから0.5ml採り、蛋白の定量を行った。この際、ウイルス液中には組織培養液中のアミノ酸が含まれているので、定量前に予め脱アミノ酸を行っておく必要がある。すなわち0.5mlのウイルス液に25%をHClO₄ 9.5ml加え、3,000 r.p.m.で10分間遠沈し、その沈渣に0.1N NaCl, 1mlを加え、溶解し、それについて蛋白の定量を行った。測定法はFolin-Ciocalteu法³⁷⁾に従って行い、分光光度計で波長750m μ を用いて読み取り、予め既知量のアルブミンで作図しておいた標準線からその蛋白量を算出した。その結果フロロカーボン処理後のウイルス液の蛋白量は約2.5mg/mlであった。このウイルス液全量約(45ml)を透析膜チューブに入れ、カーボワックス (polyethylene glycol) 内に浸して約4倍に濃縮し、蛋白量がほぼ10mg/mlとなるように調整した。

(3) A 抗原の精製³³⁾

蒸留水で膨化させたDEAEセルロース(0.8mEq/gr)を1N HClで洗浄、中性になるまで蒸留水で洗い、更に1N NaOHによって十分に活性化、pH7.0, 0.01Mのリン酸緩衝液で完全に飽和、直径1cmのカラムに10cmの高さまで充填した。更に上記緩衝液で洗浄、液面がカラム上面に近ずいたところで、予め同緩衝液で十分に透析しておいた前記精製ウイルス液を静かに注ぎ、その液面がカラム上面に達してから0.01M, 0.025M, 0.05M, 0.075M, 0.1M, 0.125M, 0.15M および0.2M NaClを含む0.01Mリン酸緩衝液10mlにより順次段階的に溶出せしめた。以上の操作はすべて4°Cの冷室内で行い、溶出速度は毎分約0.2mlとした。こうして得られた各分画液について、予め作成しておいた抗アデノウイルス12型家兔免疫血清との間にゲル内沈降反応 (Ouchterlony 法)³⁸⁾を行ったところ、分画1~2 (0.01M~0.025M NaCl分画)に1本、分画5~8 (0.1M~0.2M NaCl分画)にもう1本の沈降線を得た。分画1と分画8につき、アデノウイルス12型粗抗原および7型粗抗原と共に、抗アデノウイルス12型家兔免疫血清との間のゲル内沈降反応を行うと、図2のごとく分画1はアデノウイルスの群共通抗原、すなわちA抗原であることが明らかとなった。つまりA抗原の大部分は殆んど純粋に分画1および2に含まれており、Huebnerらの報告³³⁾ともよく一致した。

(4) A 抗原の標識

こうして得た分画1と分画2の全量を混和し、その

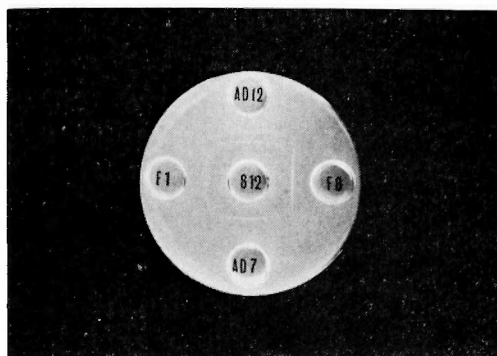


図 2 分画 1 および分画 8 の性状

S12 : 抗アデノウイルス12型家兎免疫血清
 AD7 : アデノウイルス 7 型粗抗原
 AD12 : アデノウイルス12型粗抗原
 F1 : 0.01M NaCl 付加リン酸緩衝液分画 (分画 1)
 F8 : 0.2M NaCl 付加リン酸緩衝液分画 (分画 8)
 F1とS12との間にみられる沈降線は AD7および AD12とS12との間に出来た沈降線とそれぞれ連結し、F1がアデノウイルス群共通抗原(A抗原)であることを示している。F8はアデノウイルス12型の型特異抗原と考えられる。

一部を採って Folin-Ciocalteu 法³⁷⁾によりその蛋白量を定量し、蛋白濃度が1.5mg/ml になるようにカーボワックスにより濃縮して全量を約6mlとした。次にこの抗原液を veronal buffer^{脚註1)}で24時間透析を行って pH. 8.7 としたのち、小ビーカーに移しマグネチックスターラーで攪拌しながら、その上に FITC (fluorescien isothiocyanate, BBL 製) を静かにのせてゆく。この際、FITC は抗原液の総蛋白量の 1/50量とし、予め少量の veronal buffer で溶解して使用した。ひきつづきマグネチックスターラーによる攪拌を24時間行つたのち、staining buffer^{脚註2)}で2日間透析を行って、遊離した FITC を完全に除去した。以上の透析、標識などの操作はすべて 4℃の暗室下で行った。なお、こうして得られたFITC 標識抗原液は、余程注意してみないと螢光色素の色調が判別しないほど無色に近い透明なもので、ルー瓶50本分の粗ウイルス液から約5~6ml 得られる。

脚註1) : 原液A : 0.015Mバルビタール (ジェチルバルビツール酸 2.67gr を蒸留水 1ℓ に溶解), 原液B : 0.5Mバルビタールソーダ (バルビタールソーダ10.3 gr を蒸留水 100 ml に溶解), 原液A 450 ml, 原液B 50ml に蒸留水 500ml を加えて pH 8.7 とする。

脚註2) : pH 7.2, 0.15M phosphate buffer saline のことで、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.45gr, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.23gr, NaCl 8.0gr を 1ℓ の蒸留水に溶解したもの

Ⅱ, 染色対象

(1) 感染実験

本法により、組織切片上の抗アデノウイルス抗体が的確に染色されることを証明するため、マウスによるアデノウイルス感染実験を行つた。すなわちマウス由来のアデノウイルス (Hartley 等³⁹⁾) によって分離された FL 株) を経口接種し、経口的に屠殺してその腸管および腸間膜リンパ節の抗体産生 (保有) 細胞の染色を本法により行くと共に、各臓器からのウィルス分離と血清中和抗体価の測定を行って比較検討した。

a. マウス胎児細胞の培養 : dd 株均一系の妊娠マウスを脱血屠殺し、無菌的に胎児をとり出し、頭部と尾を除いた 8~10尾分を少量の Hanks 液の入ったシャーレ内でハサミにより細切したのち、digestion flask に入れ、0.1%トリプシン加 PBS に浮遊させ、室温で30分間マグネチックスターラーによる攪拌を行つた。ついで滅菌ガーゼによりこれを濾過して、大きな組織塊を除去したのち、これと同量の10%仔ウシ血清加 Eagle 培養液を加えてトリプシンの不活性化を行い、2,000 r.p.m. 5分間遠沈し、その沈渣を 3%仔ウシ血清加 Eagle-MEM に再浮遊させた。この際、浮遊液を 0.5 ml とり0.5%トリパンブルー水溶液を当量加え直ちに赤血球用計算板によりトリパンブルーに染まらない細胞 (生細胞) の数を計算し、細胞数が $3 \times 10^5/\text{ml}$ となるように上記の浮遊液を調整した。平角型培養瓶 (ルー瓶) にこのマウス胎児細胞浮遊液を 50ml ずつ注入し、37℃下に培養を行つた。

b. 感染ウイルスの増殖 : こうして得たマウス胎児 2 代目培養細胞に、マウスアデノウイルス FL 株 (以後 MAd と略す) を接種した。接種方法は、前述のアデノウイルス12型の場合と同様である。37℃下に4日間培養をつづけ、顕微鏡下で細胞変性効果が十分に生じていることを確認したのち、これを回収し、凍結、融解を5回繰返し行つて感染用 MAd ストックとした。なおこのウィルス液の感染価は、上記の2代目マウス胎児細胞の培養管 5 本ずつに $0.5 \log_{10}$ とびの希釈で接種し、回転台法にて2週間観察し、Reed-Muench 法で計算したところ約 5×10^6 TCD₅₀/ml であった。

c. 感染方法 : 日令40~50日の dd 株均一系マウスの胃へ、経口的に細いポリエチレンチューブを挿入し、上記の MAd 液 0.3ml を注入した。こうして MAd を経口接種されたマウスは、3~10日後にその約30%が

回腸粘膜上皮の強い出血性壊死を伴って斃死するが、これを除外し、MAd 接種前および接種後 3, 7, 10, 14, 21, 28日にそれぞれ3尾ずつ脱血屠殺した。

d. ウィルス (MAd) の分離: 各マウスにつき、その回腸および腸間膜リンパ節の10%ホモジネートを作成し、その遠沈上清を前記のマウス胎児細胞培養管に接種培養し、その細胞変性効果出現の有無により判定した。なお一部の例については、あとで述べる蛍光抗原法用エタノール固定パラフィン包埋切片を用いて、MAd 免疫モルモット γ -グロブリン (FITC 標識) による蛍光抗体法直接法を行い、MAd 抗原の組織内局在を観察した。

e. 血清中和抗体価の測定: 使用ウィルスは前述の接種用を予め Hanks 液で 2×10^2 TCD₅₀/ml に希釈したものを用い、血清希釈法により測定した。すなわち、屠殺する際に心臓穿刺により各グループ (3尾) 毎に集めた血清を 56°C, 30分間加熱し、非働化し、Hanks 液により2倍階段希釈で1:4から1:128までの希釈列を作り、この各希釈血清 0.5ml とウィルス液 0.5ml (10^2 TCD₅₀) を混和して 37°C 下に1時間反応させた。この血清ウィルス混合液 1.0ml を前述したと同様の方法で得たマウス胎児細胞2代目培養4本ずつに接種し、血清対照管、ウィルス対照管とをそれぞれ何れも 37°C 下に1週間培養し、連日観察して細胞変性効果を阻止する血清の最高希釈培数を計算した。

(2) 臨床例

小児腸重積症の患児で手術により治療されたもののうち、その虫垂あるいは腸間膜リンパ節を得ることが出来た6例につき、アデノウィルスに対する血清補体結合抗体価の測定を行うと共に、マウス感染実験の際と同様の方法で固定切片を作成し、次項で述べるような染色を行い検索した。また虫垂炎の虫垂、潰瘍性大腸炎や結腸癌例の結腸についても若干例の染色を試みた。

Ⅲ. 染色方法

(1) 固定切片染色

感染実験マウスおよび臨床例の虫垂、腸間膜リンパ節等を採りだしそれを小片とし、4°C 95%エタノールで24時間固定したのち、冷無水エタノールで3日間脱水し、冷キシロール処理後、60°Cパラフィンで包埋して型の如く無蛍光ガラス上に切片を作成した。キシロールによる脱パラフィンを行ったのち 99%, 95%, 70%, 45%エタノールで順次処理し、冷 staining

buffer^{脚註2)}で洗滌後、標本周辺の緩衝液をふきとり、前述の蛍光抗原液 (FITC 標識アデノウィルス抗原液) を1滴のせ、湿潤な暗箱に入れて室温で3時間反応させた。反応後冷 staining buffer で少なくとも10分間、更に液を3回取替えて十分に洗滌を行い、反応に与からなかった蛍光抗原液を除去し、glycerin buffer^{脚註3)}を1滴のせ、更にカバーガラスをのせたのち、その縁をマニキュアで封じ、組織が乾燥しないようにした。

(2) 生細胞染色 (膜染色)

感染実験マウスのうち、非接種マウスおよび MAd 経口接種7日目のマウスの腸間膜リンパ節を用いて、生きた状態下にあるリンパ球の細胞膜染色を行った。すなわち脱血屠殺後のリンパ節を無菌的に採取し、ハサミによる細切を行い、少量の staining buffer に浮遊させピペットによる吸上げ吹出しを数10回行い細胞を出来るだけバラバラとしたのち約2分間静置し、沈殿しない部分を遠沈管に採取、次いでこれを 1,000 r.p.m. 10分間遠沈、上清を捨て、沈渣に蛍光抗原液を約0.5ml 加えて 37°C で約30分間反応させた。なお蛍光抗原液を加えるまでの操作は 4°C の冷室で行った。反応後、冷 staining buffer で3回遠沈、洗滌を繰返し、その沈渣をごく少量の glycerin buffer に浮遊させ、その1滴を無蛍光ガラスの上にのせ、カバーガラスをかぶせてマニキュアで封じた。

Ⅳ. 観察法

超高压水銀ランプによる励起光発生装置を装備した Carl Zeiss 社の蛍光顕微鏡を用いて鏡検したが、その際 365m μ を中心とした励起波長の U. V. フィルターを使用した (UV励起方式)。また接眼部には UV 吸収フィルターを併用した。標本と暗視野コンデンサーとの間には無蛍光グリセリンを用いた。

写真撮影は主にスライド用カラーフィルム (ASA 100) を用いたが、プリント用として、Trix (ASA 400) をも併用した。露光時間は 400 倍の場合、ASA 100 で1~2分が適正露出であったが、生細胞染色の場合には、この約2倍の露光時間を要した。

実験成績

I 感染実験成績

MAd 経口接種後3日目よりウィルスは腸管より分

脚註3): 前記 staining buffer 1 容と無蛍光 glycerine 9 容とを充分に混和したもの。

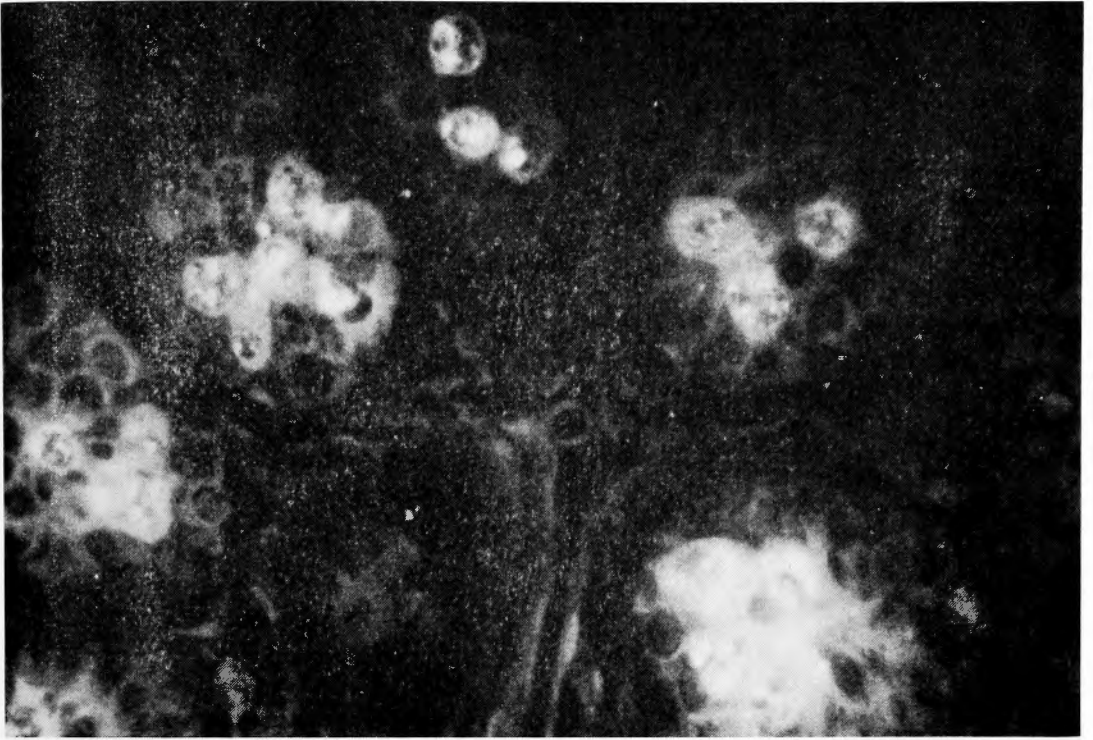


図 3 マウスアデノウィルス経口感染10日後のマウス回腸 Lieberkühn 氏腺細胞核内に
限局するウィルス抗原（蛍光抗体法）。×1,000

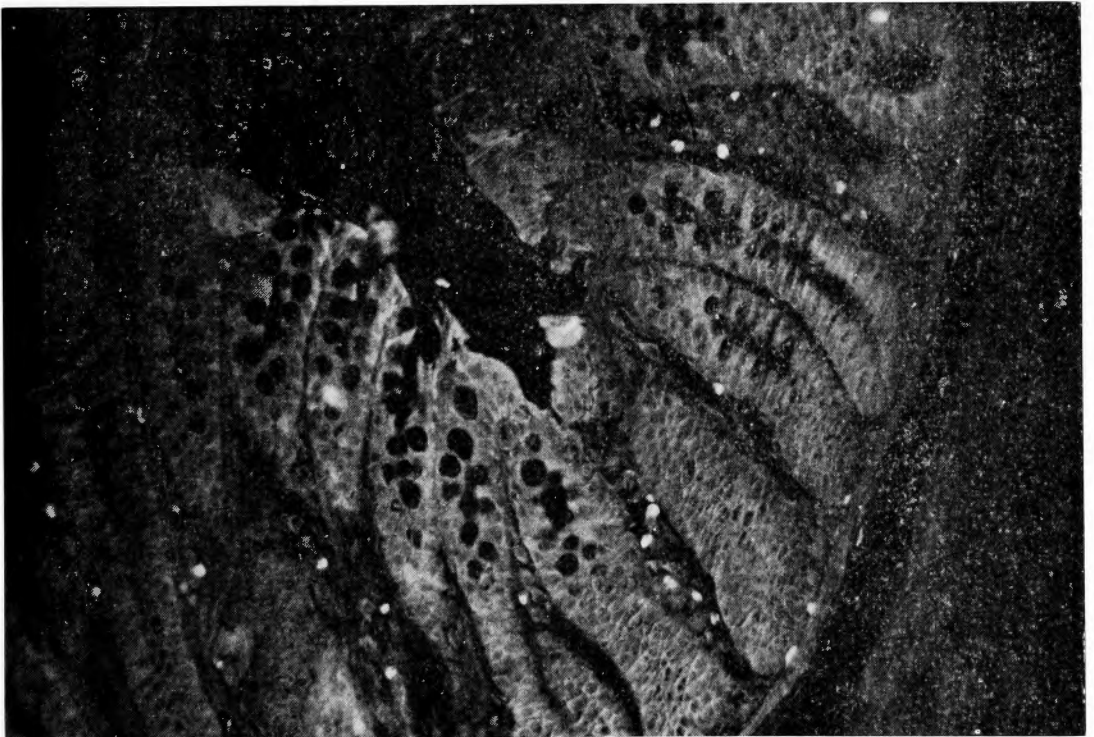


図 4 経口感染14日後のマウス回腸粘膜固有層の円形細胞に限局する
抗アデノウィルス抗体（蛍光抗体法）。×160

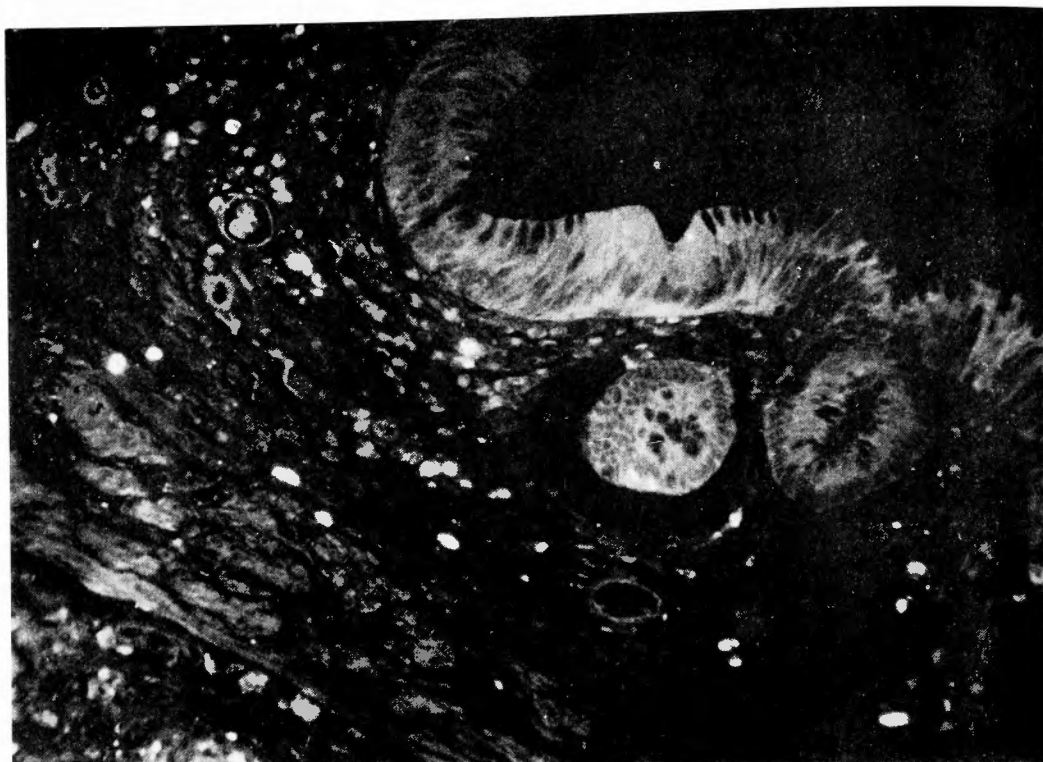


図5 2才女児腸重積症例の虫垂. 蛍光抗原法により, 粘膜固有層を中心に抗アデノウィルス抗体保有細胞が散在しているのが認められる. $\times 160$

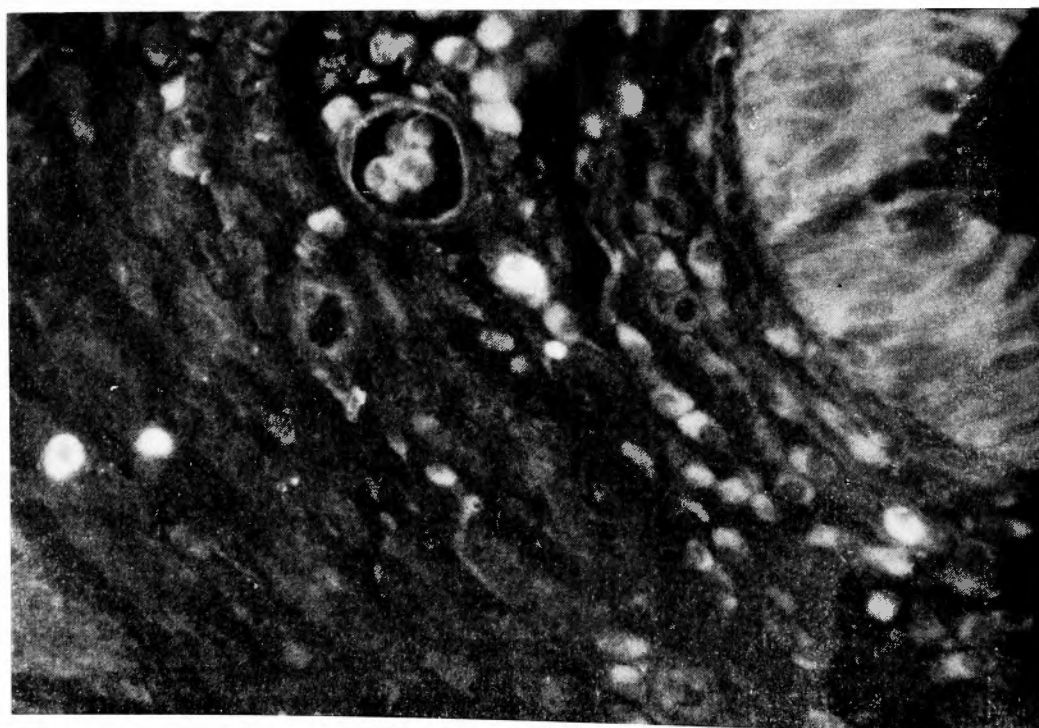


図6 図5の左上方の拡大. $\times 400$

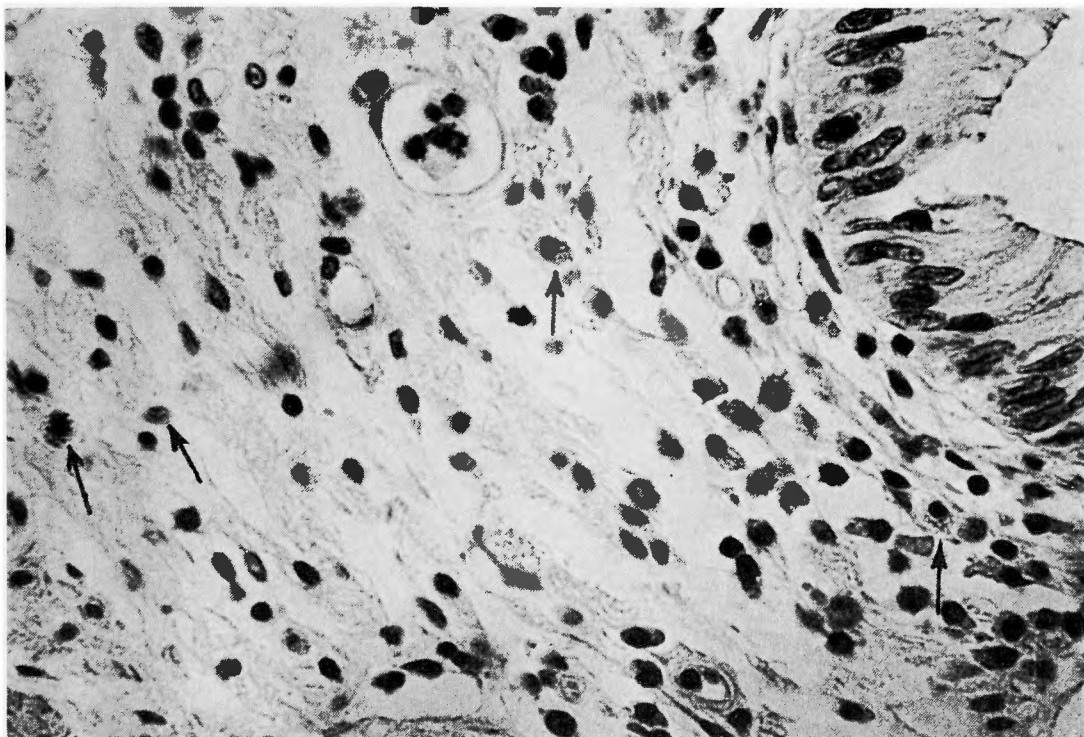


図7 図6の標本をヘマトキシリン・エオジンで後染色したもの、図6で見られた蛍光保有細胞(=抗アデノウィルス抗体保有細胞)は形質細胞であることが確認できる。×400

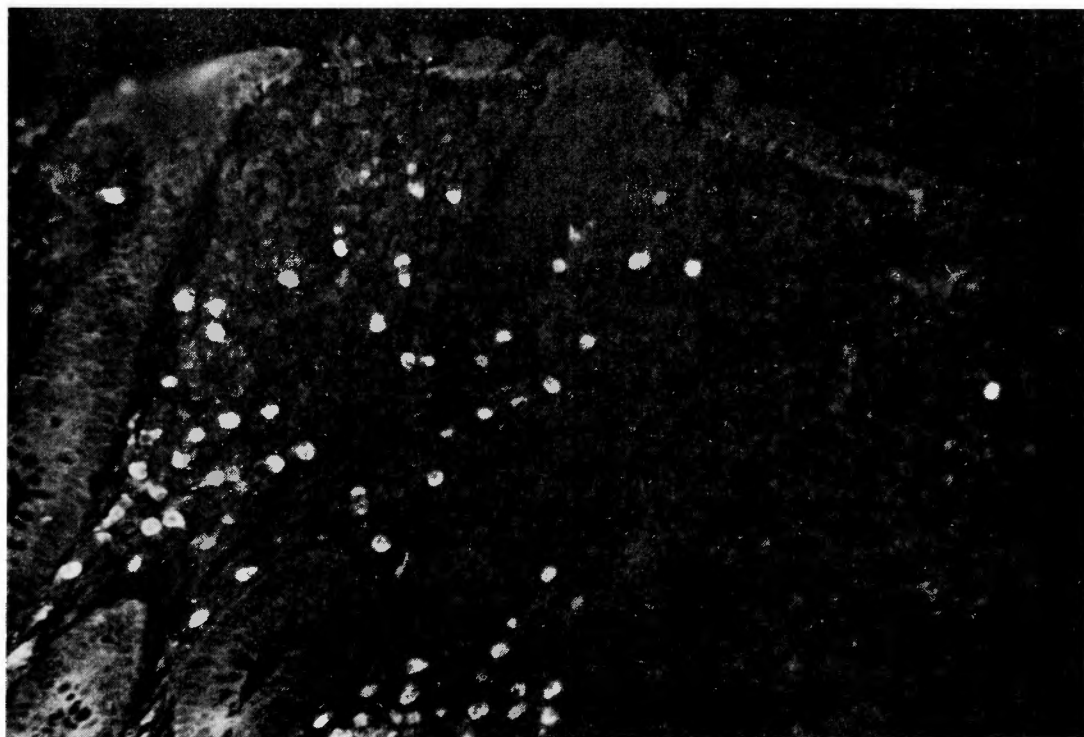


図8 カタル性虫垂炎の虫垂、蛍光抗原法により、粘膜固有層にかたまって抗アデノウィルス抗体保有細胞が存在していることが判かる。×160



図9 結腸癌患者の非癌部分・粘膜固有層に抗アデノウィルス抗体保有細胞が散在する(蛍光抗原法). $\times 160$

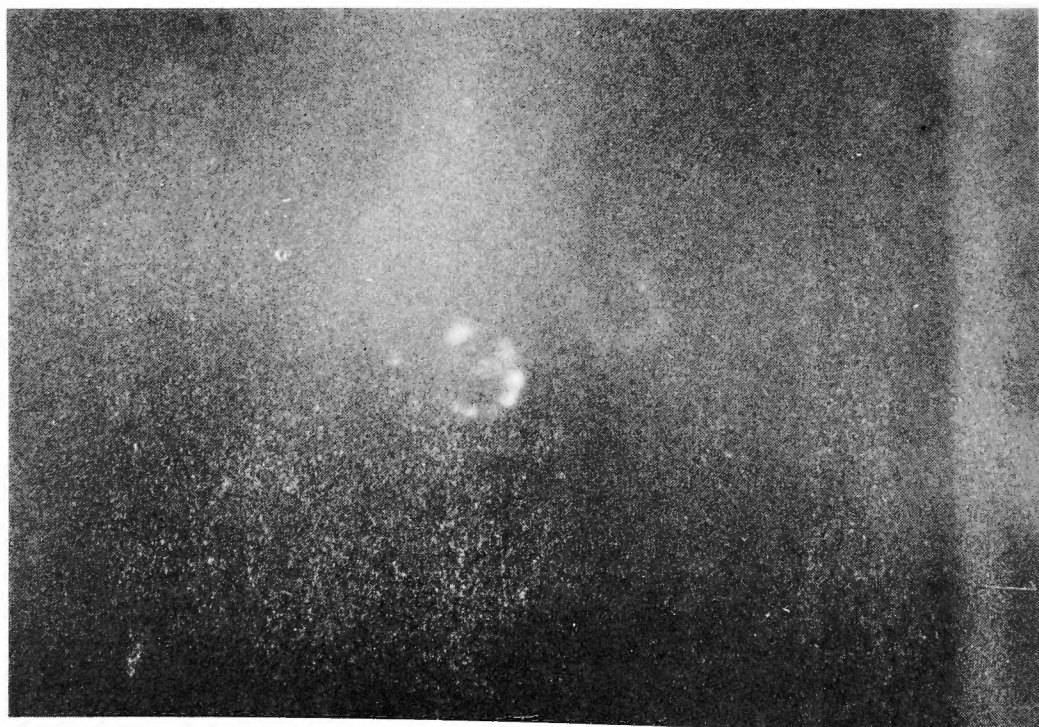


図10 マウスアデノウィルス経口感染7日後のマウス腸間膜リンパ節のリンパ球(膜蛍光抗原法). リンパ球様円形細胞1,000個に約10~20個の割合で膜部分に特異蛍光を認める. $\times 1,000$



図11 螢光抗原法の特異性の証明 マウスアデノウィルスに感染させたマウス胎児細胞（カッパースリップ上，単層培養）にまず抗マウスアデノウィルス家兎免疫血清を反応させ，次いで FITC 標識アデノウィルス A 抗原（螢光抗原液）を反応させると感染細胞核内の封入体（ウィルス抗原）に一致して螢光が認められる． $\times 1,000$

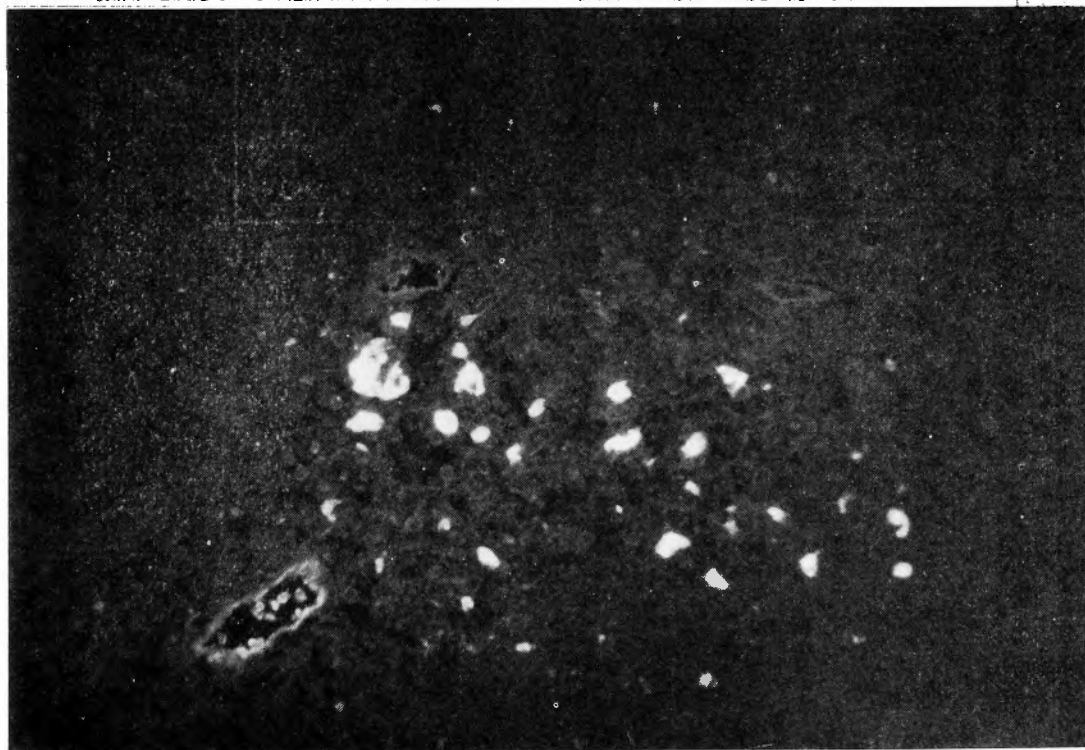


図12 正常マウスの尾静脈に FITC 標識アデノウィルス A 抗原液を注入し，30 分後に屠殺し末染色のまま螢光顕微鏡で観察したもの． $\times 160$
胸腺の小葉間結合織に特異螢光（抗原）を取り込んだマクロファージが見られる。

離されるようになり、7～10日目にはピークとなった。図3は接種後10日目の回腸を抗MAdモルモット免疫グロブリン（FITC標識）を用いて行った蛍光抗体法の写真であるが、Lieberkühn氏腺上皮細胞の核内に典型的なアデノウイルス抗原（封入体）を認めることが出来る。その後次第にウイルスは回腸より姿を消してゆき、接種後2週間以後では、ウイルス分離によっても蛍光抗体法によっても、ウイルス抗原は証明できなくなった。

一方、蛍光抗原法による抗アデノウイルス抗体産生（保有）細胞の検索では、ウイルス接種7日目頃より、回腸粘膜固有層や腸間膜リンパ節の髄索付近の円形細胞の細胞質に典型的な特異蛍光を認めるようになり、この細胞は日を経るに従い数が増えてくる（図4）。

表1は、この蛍光抗原法の染色状況を、ウイルス分離成績および血清中和抗体価の推移と共にまとめたものである。非感染例や感染直後のものでは、蛍光抗原法では全く蛍光を有する細胞は認められないが、ウイルス感染が極期を過ぎ、血清中和抗体価が上昇しはじめると共に、蛍光（特異抗体）保有細胞が増加して行くことがわかる。

Ⅱ. 臨床例

表2は小児腸重積症の6症例についてみた血清抗体価および蛍光抗原法検索の結果を示すものである。6例中4例に蛍光抗原法により抗アデノウイルス抗体保有細胞が認められたが、このうち症例5と6では血清

補体結合抗体価の推移からみてアデノウイルスに感染したのは最近と推察された。症例3と4は2週間後のペア血清の検索がなされていないので最近感染したことを積極的に支持することはできない。しかし初診時の抗体価は4倍でさほど高くないにもかかわらず、蛍光抗原法では虫垂と腸間膜リンパ節に抗アデノウイルス抗体保有細胞が明らかに認められた。このように血清抗体価の上昇が充分でないのに蛍光抗原法で細胞内に抗体が証明されるということは、マウス感染実験においてもみられたことで（表1）、蛍光抗原法の方が血清抗体価の測定より感度が高いためか、それとも細胞内抗体と血中抗体の出現の時期に時期的ズレがあるのかの何れかであろう。

図5は症例3の虫垂で、細胞質内の特異蛍光を有する円形細胞が粘膜固有層を中心に散在してみられる。図6はこの左上方の強拡大である。蛍光保有細胞が4個みられ、そのうち細胞の端しが見えない1個を除けば、その他のものは何れも円形の核が偏在し、やや円形を呈している。写真撮影後カバーガラスを注意深く取除き、型の如くヘマトキシリンエオジン染色を行って同じ部分を普通の光学顕微鏡で撮影してみると（図7）、図6でみられた蛍光保有細胞はすべて形質細胞のように思われる。この際蛍光が呈する部分は顆粒状を示している。このような所見は隣接切片のヘマトキシリンエオジン染色では認められないことからこの顆粒は本法施行の結果生じた抗原抗体複合物ではないか

表 1

	感染前	3	7	10	14	21	28日後
血清中和抗体価	<4	<4	<4	4	8	32	32
ウイルス分離	{回腸	—	+	++	+	—	—
		—	—	+	—	+	—
蛍光抗原法	{回腸	—	+	+	+	++	++
		—	—	+	+	++	++

表 2

症 例	1	2	3	4	5	6
年 令 (月) 性 別	19 ♀	5 ♀	14 ♀	6 ♂	5年♂	3 ♀
抗アデノウイルス中和抗体価	初診時	<4	<4	4	4	32
	2 週 後	×	×	×	×	128
抗アデノウイルス抗体 (虫垂) (蛍光抗原法)	—	—	+	+	+	+

(×は検索できなかったもの)

と考えられる。また症例1の螢光抗原法染色では、このような螢光保有細胞は全くみられず、血清補体結合抗体価が4倍以下であるという事実とよく一致する。

一方、成人の虫垂炎では、本法によるとその大半の虫垂に特異螢光保有細胞が認められた。このことは成人ではアデノウイルス群の感染を既に受け、而も腸管壁が抗アデノウイルス抗体産生の有力な母地となっていることを物語る。図8は12才のカタル性虫垂炎の虫垂で、抗アデノウイルス抗体保有細胞が数多く認められるが、こうした細胞は万遍に散在することはむしろ少く、虫垂を輪切りとした標本でみると、10数個ずつかたよった部分が全視野に3~4個所認められることが多い。またリンパ小節内に存在することも稀で、腸間膜リンパ節においても、皮質ことに胚中心にはこのような螢光保有細胞を認めることは殆んどない。

結腸においても、本法で染色した際、虫垂と同様に粘膜固有層に特異螢光すなわち抗アデノウイルス抗体を保有する細胞が散在してみられる。図9は結腸癌患者の結腸非癌部分を螢光抗原法で染色したものであるが、螢光保有細胞の数に多少の差はあっても本質的には、前述の虫垂と同様の所見である。ところが、潰瘍性大腸炎の結腸非潰瘍部の染色では、わずか2例に行ったに過ぎないが、何れも特異螢光保有細胞の数は極度に減少しており、全視野に2~3個認めるに過ぎなかった。

Ⅲ. 生細胞染色（膜螢光抗原法）

図10はMAd経口接種7日目のマウスの腸間膜リンパ節から得た浮遊細胞に本法を行ったものであるが、小円形細胞の細胞膜に相当してリング状の特異螢光が認められる。またあるものでは、いわゆるcap formationをみる事が出来る。このような細胞は非接種マウスでも稀にみられるが、接種マウスに比してその数は遙かに少い。この細胞膜部分に螢光を有する細

胞の同定のために、同視野を位相差顕微鏡で観察すると、それが小ないしは中リンパ球であることが推察された。

本法の特異性の証明

I. Blocking test.

上記の染色で明らかに螢光を認めた例のブロックより、もう一枚の切片を作成し、予め非標識の抗原液で反応させたのち、型通り螢光抗原液による染色を行っても殆んど螢光を認めることは出来なかった。これは先に行った反応で非標識抗原と切片内の特異抗体が結合してしまうので、あとから反応させた標識抗原が抗体と十分に結合し得ないことを示している。

Ⅱ. 非染色切片の鏡検（自己螢光の除外）.

同様の切片を脱ぐパラフィンしただけの状態では、螢光顕微鏡の励起光により発生する自己螢光を観察したが、上述の如き特異螢光は全く認めなかった。

Ⅲ. Sandwich 法による証明

マウス胎児細胞の単層培養を前述の方法でカバースリップ上に作成し、これにMAdを接種した。細胞変性効果がみられたのち、冷70%エタノールで固定し、あらかじめ作成しておいた抗MAd家兎疫血清をこの上にのせて室温で30分間反応させた。ついでこの血清を冷staining bufferで十分に洗い落してから螢光抗原液を反応させると、これが先に反応させ組織と結合した疫血清と特異的に結合するため、結局（培養細胞内ウイルス抗原）+（抗ウイルス特異抗体）+（螢光抗原液）となって、マウス胎児細胞核内のアデノウイルス特有の封入体（ウイルス抗原）の部分に特異螢光が証明される（図11）。表3からも明らかなように、螢光抗原法はその特異性の点からみて、きわめて秀れた手技といえよう。

表 3 螢光抗原法の特異性の証明

マウス胎児細胞（カバースリップ上単層培養）			
マウスアデノウイルス接種　2日後固定		非　接　種	
抗マウスアデノウサギ血清 （FITC 標識） 螢光抗体法	抗マウスアデノウサギ血清 （非標識）	抗マウスアデノウサギ血清 （非標識）	
	アデノウイルスA抗原（FITC 標識） 螢光抗原法		
（螢光顕微鏡下で観察）			
封入体に螢光	封入体に螢光	螢光（－）	螢光（－）

考 按

抗体の存在を組織切片上で認識しようという試みは、以前よりいろいろ考えられてきた。Coons ら¹¹⁾は蛍光抗体法を応用して、予め組織切片に非標識の抗原を反応させ、抗原抗体結合物を作らせた後、別に用意した標識抗体を更に反応させて組織上の抗体の局在を鏡検する方法(サンドウィッチ法)(図1のa)を案出したが、この手技は抗体産生機構の解析に広く応用された。すなわち、White¹²⁾は2種の抗原で感作した家兎のリンパ節につき、おのおの抗原に対する抗体をそれぞれフローレンセンおよびローダミンで標識しておいて、このサンドウィッチ法の二重染色を行い、また Hiramoto と Hamlin¹³⁾も同様の手技を用いて2種の抗原決定基に対する抗体を染め別けている。

ところがこの方法では、組織切片上の抗体のみならず、もともと抗原が共存しているような場合には、当然のことながらこの抗原にも標識抗体液は結合するので、切片上の抗体の存在と抗原の存在とを判別することは不可能となるし、またこの際には切片上で抗原抗体反応を2回繰返し行うことになるので非特異的蛍光の介入してくる可能性が多くなり、これを避けるためにはこの際用いる抗原液や標識抗体液の精製を更に一層厳密に行うことが必要となってくる。

そこで Berenbaum^{14), 15)}は、放射性同位元素で標識した抗原を組織切片上で反応させたのち、オートラジオグラフィーによって抗体の存在をフィルム上に描出する方法を案出し、その特異性を示すと共に抗体量の測定も可能であるとし、Green ら¹⁶⁾はこの方法とサンドウィッチ法との併用を試みている。ただこの方法は感度こそすぐれてはいるものの、放射性同位元素を使用せねばならないことや、顕微鏡下で直接観察できないといううらみがあり、また写真の露出(感光)に数日ないし数10日を要するなど、手技上の制約があり、必ずしも満足すべき方法とはいえない。

また蛍光抗体法においては、蛍光色素で標識されるのは目標とする抗原に対する特異抗体だけではなく、他の免疫グロブリン全体が標識されることになり、従って蛍光抗体液の臓器吸収や慎重な対照染色によって初めて特異性を主張し得るのに対して、本法は厳密に精製された抗原そのもののみが標識されているわけであるから、非特異的蛍光の介入する余地は殆んどない。当初は蛍光抗体法に準じて、この蛍光抗原液をセファデックスカラムに通してから染色に用いていた

が、この操作は不必要のようである。本法は極めて特異性に富み、蛍光抗体法に熟達していれば比較的容易に行い得る秀れた手技であると考ええる。

このような手技が従来無かったためか、非特異性腸間膜リンパ節炎や小児腸重積症の成因の1つとしてアデノウイルス感染が推測され^{8)-10), 45)-51)}またアデノウイルスの有力な増殖の場として回腸が注目されながらも⁵²⁾⁻⁵³⁾、未だアデノウイルスに対する特異抗体の存在を腸管あるいは腸間膜リンパ節に認め得たとの報告はみられない。

当然のことながら、腸管は常に外来からの抗原刺激に曝されている。従って、その刺激がウイルスであれば、細菌であれば、それら抗原性物質から生体を防護するためには、そこになみなみならぬ免疫反応がその第一次防禦線である腸管粘膜あるいはその第二次防禦線である腸間膜リンパ節で繰返し行われていることは推察に難くない。事実、蛍光抗体法を用いて腸管壁の免疫グロブリンを検索したところによると、正常の腸管においても粘膜固有層には数多くの免疫グロブリン保有形質細胞が存在し、而もその免疫グロブリンの分布も、血清においてはIgGが大部分を占めるのに対して、腸管ではIgAが大半を占めており^{54)-57), 69)}、このIgAこそ腸管における防護機構の主役をなしているものと考えられる⁵⁸⁾。Porter ら⁵⁹⁾は、ブタの腸管分泌物を集め、免疫電気泳動法により、その中に含まれている免疫グロブリンの80%以上がIgAであることを立証、また直接赤血球凝集反応によって大腸菌に対する抗体価を測定し、この抗体価が抗IgA家兎血清の処理により殆んど零になることから、抗大腸菌抗体はIgAに属するものとしているが、その際抗大腸菌抗体の所在を直接鏡検したわけではなく、蛍光抗体法によるIgAの観察から抗大腸菌抗体のあり方を予想しているに過ぎないのである。その点ここに掲げた「蛍光抗原法」ともいうべき方法は、特定の抗原(アデノウイルス)に対する特異抗体(抗アデノウイルス抗体)の存在を、顕微鏡下で直接観察できるので、抗体産生の過程をみる上で極めて好都合な手技である。腸管における特異抗体の存在をこのようにして鏡検した報告は筆者の知るかぎりでは、今日までのところ全く見当たらない。

今回のマウスアデノウイルスの感染実験と臨床例の検討の第一の目的は、この蛍光抗原法の特異性の確認であったが、これとは別になお2、3の興味ある知見をも得た。その1つは同一切片上にウイルス抗原とこ

れに対する特異抗体が共存していることである。すなわち、アデノウイルス接種後10日目のマウスの回腸では、なお盛んにウイルスは増殖しており、これは腸管ホジネートよりの分離成績の他、螢光抗体法によっても Lieberkühn 氏腺窩の上皮細胞核内の封入体に一致してウイルス抗原が観察される(図3)ことから、最早確かである。それと同時にその隣接切片を螢光抗原法に染色してみると回腸粘膜固有層に抗アデノウイルス抗体をその細胞質内に保有(単なる保有なのか産生なのかは一応問わないこととする)している形質細胞をもまた既に散見し得るからである。この時期の血清中和抗体価はなお充分に上昇していないのに、ウイルス抗原の存在する局所に特異抗体が出現していることは、非常に興味深い知見で、更に腸間膜リンパ節の生のリンパ球の螢光抗原法染色(膜染色)においても、感染7日目で既に細胞膜に特異抗体(receptor)を保有するリンパ球が、非感染マウスに比して数多く認められるという成績と併せ考え、アデノウイルス感染というモデルに、この螢光抗原法と従来の螢光抗体法を併用するならば、抗体産生機構の解明は更に一段と進歩するものと期待される。また、本法に用いた螢光抗原液(FITC 標識アデノウイルスA抗原)をマウスの静脈内に注射すると、この標識されたウイルス抗原は30分後にいたると主として胸腺のマクロファージに捕捉され(図12)、数日後にいたるとその周辺に特異抗体保有細胞も出現してくる⁶⁰⁾。このことは、アデノウイルス感染マウスでは、特異抗体がかなり早期にまず胸腺に出現するという正木の報告⁷²⁾と考え併せ、興味深い。

一方、膜螢光抗原法は未だ染色経験も浅く、染色条件の改善、膜螢光陽性細胞の固定、陽性細胞出現率算定方法の工夫など多くの問題が残されているが、その特異性については固定切片染色同様に問題はないと考える。リンパ球のあるものの細胞膜面に免疫グロブリンが存在することは1970年 Raffら⁶²⁾が報告して以来、この免疫グロブリン(surface immunoglobulin または receptor γ -globulin の名で呼ばれている)についての研究が、主に抗グロブリン血清による螢光抗体法によってなされてきた^{41), 63)~66)}。このようなその細胞膜面にグロブリンを有するリンパ球は、骨髓由来のもの約半数はこれであるといわれている。Loorら⁴¹⁾、Pernisら⁶³⁾はこのリンパ球表面の免疫グロブリンがある特定の抗原と対応していることを観察している。すなわちタバコモザイクウイルスやフェリチンで

感作した場合と非感作の場合とについて、まず抗原を反応させたあとに、それぞれに対する標識抗体を結合させるという、いわゆるサンドウィッチ法によりリンパ球の膜グロブリン(膜抗体)を観察している。しかし、さきにも述べたように、サンドウィッチ法は本法に比べて特異性の上で劣り、またこの場合は生のリンパ球を扱うこともあって一回の短時間の操作で済む本法の方が秀れていることはもとより明らかである。今後、アデノウイルス感作をモデルとしたリンパ球膜免疫グロブリンの解析に本法が有力な手技として用いられるに至るものと大いに期待される。

臨床例の検討では、共同研究者の正木は、虫垂炎患者の虫垂の約半数に、本法によって抗アデノウイルス抗体保有細胞の出現を観察しているが、Potter⁶¹⁾も正常児血清の約87%までがアデノウイルス1, 2, 3, 5, 6, 7型の少くとも何れかに対する中和抗体を保有しているとしている。結腸においても、細胞の数こそ少いが抗アデノウイルス抗体保有細胞が認められる^{67), 69)}。結腸癌患者の非癌部分の本法による染色でも全例に抗体保有細胞がみられた。しかし潰瘍性大腸炎の2例では、わずかに散見されるに過ぎなかった。Gelzaydら⁶⁸⁾が潰瘍性大腸炎患者の直腸における免疫グロブリンの分布を観察したところによると、潰瘍性大腸炎では粘膜固有層における免疫グロブリン、とりわけIgA保有の形質細胞の数の減少が著明であったという。筆者らも現在 Crohn 病や潰瘍性大腸炎における腸管の色度グロブリンの分布について検索をすすめているが、Gelzayd とほぼ同様の結果を得ている⁶⁹⁾。抗アデノウイルス抗体保有細胞がこの際殆んど認められないが、それは潰瘍性大腸炎における腸管の局所免疫機構の低下の1つの表現に過ぎないのか、あるいはアデノウイルス関与の如何にもとずくものであるのか、そのような点については今のところ全く不明である。

この螢光抗原法は、現在のところアデノウイルスについてのみ行っているが、今まで述べてきたようなアデノウイルスの感染病理の検討はもとより、アデノウイルス誘発癌や、アデノウイルス感染にひきつづき発症するといわれている小児腸重積症、腸間膜リンパ節炎あるいは軽症虫垂炎などの発症機作の研究にも応用され得るであろうし、更に本法とローダミン標識の抗IgG, 抗IgA, 抗IgM 抗体による螢光抗体法との二重染色により、抗ウイルス抗体とIgA, IgG, IgMとの関係を検索^{70), 71)}し得る点など、抗体産生機構の解明に有力な手段を提供するものと期待される。

アデノウィルスのA抗原の場合、その精製方法がほぼ完成されているうえに、分子構造もかなり明らかにされており、 γ -グロブリン同様にFITCのイソチオシアン基と反応してチオカーバマイド結合を作って標識され得ることがある程度予測された訳であるが、他のウイルスなどの抗原がこのように比較的容易に標識され得るか否かは今後の問題としてされている。

結 語

アデノウィルスの可溶性抗原のうち、群共通性のA抗原を精製し、螢光色素を標識して螢光抗体法に準じた方法で組織切片上の抗アデノウイルス抗体を特異的に染色する手法を考案し、マウスによるアデノウイルス感染実験および臨床例の検討より、本法の特異性を証明すると共に、本法を用いて、ウイルス感染に対する宿主の免疫学的応答に関する2,3の新しい知見を得た。

本論文の要旨は、第5回国際組織細胞化学学会(1972.8.京都)で発表した。

本研究は、京都大学医学部外科学教室木村忠司名誉教授、日笠頼則教授ならびに京都大学ウイルス研究所植竹久雄教授の御指導のもとに、京都大学医学部外科学教室正木直也氏、磯辺善成氏、戸部隆吉助教授および新潟大学ウイルス学教室 浜田忠弥教授と行った協同研究の一端である。諸先生に心から謝意を表すると共に、有益な示唆と御教示をいただいた京都大学病理学教室浜島義博教授と京都大学ウイルス研究所花岡正男教授に深謝する。なお本研究の一部は財団法人阪本奨学金の援助を受けたものであり、付記して謝す。

文 献

- 1) Tobe, T.; Inapparent virus infection as a trigger of appendicitis. *Lancet*, 1: 1343-1346, 1965.
- 2) Bonard, E. C. and Paccaud, M. F.: Abdominal adenovirus and appendicitis. *Helvetica Med. Acta.*, 33: 164-171, 1966.
- 3) Jackson, R. H., et al.: Viruses in the aetiology of acute appendicitis. *Lancet*, 2: 711-713, 1966.
- 4) 戸部隆吉: 虫垂炎の Trigger としてのウイルス感染, 日本医事新報, 2166, 27-31, 1965
- 5) 戸部隆吉, 堀越雄三郎: 虫垂炎の成因——虫垂炎の Trigger としてのウイルス感染, 外科治療, 14: 415-421, 1966.
- 6) 戸部隆吉: ウィルス性虫垂炎について——Coxsackie B5 型ウィルスをもつての経口感染猿における免疫組織学的研究の示唆するもの,

日本臨床, 25: 1263-1271, 1967.

- 7) Tobe, T., Horikoshi, Y., Hamada, C. and Hamashima, Y.: Virus infection as a trigger of appendicitis; Experimental investigation of Coxsackie B5 virus infection in monkey intestine. *Surgery*, 62: 927-934, 1967.
- 8) 児玉 宏: 小児腸重積症の成因に関する研究, 日本外科室函, 41: 160-167, 1972.
- 9) 戸部隆吉, 児玉 宏, 正木直也, 浜田忠弥: 腸重積症, 虫垂炎とウィルス, 治療, 53: 873-878, 1971.
- 10) 戸部隆吉, 児玉 宏, 正木直也, 陳 世沢, 浜田忠弥: 腹部外科領域におけるウィルス学の諸問題, 日本医事新報, 2533, 9-13, 1972
- 11) Coons, A. H., Leduc, E. H. and Connolly, J. M.; Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J. Exp. Med.*, 102: 49-60, 1955.
- 12) White, R. G.: Antibody production by single cells. *Nature*, 182: 1383-1384, 1958.
- 13) Hiramoto, R. N. and Hamlin, M.: Detection of two antibodies in single plasma cells by the paired fluorescence technique. *J. Immunol.*, 95: 214-224, 1965.
- 14) Berenbaum, M. C.: Autoradiographic localization and measurement of intracellular antibody using labelled antigen. *Nature*, 117: 46-47, 1956.
- 15) Berenbaum, M.C.: The autoradiographic localization of intracellular antibody. *Immunology*, 2: 71, 1959.
- 16) Green, I., Vassalli, P., Nussenzweig, V. et al.: Specificity of the antibodies produced by single cells following immunization with antigens bearing two types of antigenic determinants. *J. Exp. Med.*, 125: 511-526, 1967.
- 17) Pereira, H. G., Allison, A. C. and Farthing, C. P.: Study of adenovirus antigen by immunoelectrophoresis. *Nature*, 183: 895-896, 1959.
- 18) Allison, A.C., Pereira, H.G. and Farthing, C. P.: Investigation of adenovirus antigens by agar diffusion technique. *Virology*, 10: 316-328, 1960.
- 19) Pereira, M. S., Pereira, H. G. and Clark, S. K. R.: Human adenovirus type 31, A new serotype with oncogenic properties. *Lancet*, 1: 21-22, 1965.
- 20) Ginsberg, H.S., Pereira, H. G., Balentine,

- R.C. and Wilcox, W.C.: A proposed terminology for the adenovirus antigen and virion morphological subunits. *Virology*, **28**: 782-783, 1966.
- 21) Klemperer, H.G. and Pereria, H.G.: Study of adenovirus antigens fractionated by chromatography on DEAE cellulose. *Virology*, **9**: 536-545, 1959.
 - 22) Haruna I., Yaoi, H., Kono, R. and Watanabe, I.: Separation of adenovirus by chromatography on DEAE-cellulose. *Virology*, **13**: 264-267, 1961.
 - 23) Wilcox, W. C. and Ginsberg, H. S.: Purification and immunological characterization of type 4 and 5 adenovirus soluble antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **47**: 512-526, 1961. 24) Valentine, R.C. and Pereira, H.G.: Antigens and structure of the adenovirus. *J. Mol. Biol.*, **13**: 13-20, 1965.
 - 25) Maizel, J. V. Jr., White, D.O. and Scharff, M.D.: The polypeptide of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components and the structure of the virion. *Virology*, **36**: 126-136, 1968.
 - 26) Green, M. and Piña, M.: Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. Isolation, purification and chemical analysis of adenovirus. *Virology*, **20**: 199-207, 1963.
 - 27) Polasa, H. and Green, M.: Adenovirus proteins, I. Amino acid composition of oncogenic and nononcogenic human adenoviruses. *Virology*, **31**: 565-567, 1967.
 - 28) Laver, W. G., Suriano, J. R. and Green, M.: Adenovirus proteins, II. N-terminal amino acid analysis. *J. Virol.*, **1**: 723-728, 1967.
 - 29) Boulanger, P. A., Flamencourt, P. and Biserte, G.: Isolation and comparative chemical study of structural proteins of the adenoviruses 2 and 5: hexon and fiber antigens. *Eur. J. Biochem.*, **10**: 116-31, 1969.
 - 30) Coons, A. H. and Kaplan, M. H.: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.*, **91**: 1-13, 1950.
 - 31) 浜島義博, 安田健次郎: 螢光抗体法・酵素抗体法. 医学書院, 東京 1971.
 - 32) 川村明義: 螢光抗体法 (fluorescent antibody technique) 蛋白核酸酵素, **11**: 1621-34, 1966.
 - 33) Huebner, B. J., Pereira, H. G., Allison, A. C. et al.: Production of type-specific C antigen in virus-free hamster tumor cells induced by adenovirus type 12. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **51**: 432-439, 1964.
 - 34) Eagle, H.: Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **89**: 362-364, 1955.
 - 35) Eagle, H.: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, **130**: 432-437, 1959.
 - 36) Gessler, A. E., Bender, C. E. and Parkinson, M. C.: A new rapid method for isolating viruses by selective fluorocarbon deprotenization. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **18**: 701, 1956.
 - 37) Kobat, E. A. and Mayer, M. M.: *Experimental Immunochemistry*. p. 22. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1961.
 - 38) Ouchterlony, Ö.: *Geldiffusion techniques. Immunological Methods* (ed. Achroyd, J. F.) p. 55. Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1964.
 - 39) Hartley, J. W. and Rowe, W. P. A new mouse virus apparently related to the adenovirus group. *Virology*, **11**: 645-647, 1960.
 - 40) Reed, L. J. and Muench, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, **27**: 493-497, 1938.
 - 41) Loor, F., Forn, L. and Pernis, B. The dynamic state of the lymphocyte membrane. Factors affecting the distribution and turnover of surface immunoglobulins. *Eur. J. Immunol.*, **2**: 203-212, 1972.
 - 42) Armstrong, J. A. and Hopper, R. K.: Fluorescence and phase contrast microscopy of human cell cultures infected with adenovirus. *Exp. Cell. Res.*, **16**: 584, 1959.
 - 43) Boyer, G. S., Denny, F. W. and Ginsberg, H. S.: Sequential cellular changes produced by type 5 and type 7 adenoviruses in Hela cells and in human amniotic cells. *J. Exp. Med.*, **110**: 827-843, 1959.
 - 44) Pereira, H. G., Allison, A. C. and Balfour, B.: Multiplication of adenovirus type 5 studied by infectivity titrations and by the fluorescent antibody technique. *Virology*, **7**: 300-324, 1959.
 - 45) Kjellén, L.: Studies on an unidentified group of cytopathic agents. *Arch. ges. Virusforsch.*, **6**: 45, 1955.
 - 46) Bell, T. M. and Steyn, J. H.: Viruses in lymph nodes of children with mesenteric

- adenitis and intussusception. *Brit. med. J.*, 2: 700-702, 1962.
- 47) Ross, J. S., Potter, C. W. and Zachary, R. B.: Adenovirus infection in association with intussusception in infancy. *Lancet*, 2: 221-223, 1962.
 - 48) Gardner, P. S., Knox, E. G., Court, S. D.M., and Green, C. A.: Virus infection and intussusception in childhood. *Brit. med. J.*, 2: 697-699, 1962.
 - 49) Rutten, A. and Oudejans, E.: Abdominal manifestations of adenovirus infection in infants. *Lancet*, 2: 597-598, 1961.
 - 50) Potter, C. W.: Adenovirus infection as an aetiological factor in intussusception of infants and young children. *J. Path. Bact.*, 88: 263-274, 1964.
 - 51) White, D. O. and Solomon, J. R.: Adenovirus and intussusception. *Med. J. Australia*, March 12, 447-448, 1966.
 - 52) 浜田忠弥, 戸部隆吉: マウスアデノウイルス感染における腸管局所抵抗性, ウイルス学の進展 1969, 63-81, 1969.
 - 53) 橋本一男, 杉山太規子, 吉川昌子, 佐々木正五: マウスにおけるマウスアデノウイルス腸管感染の解析, 第16回日本ウイルス学会総会, 盛岡, 1968. (抄録 p. 2059)
 - 54) Crabbé, P. A., Carbonara, A. O. and Heremans, J. F.: The normal human intestinal mucosa as a major source of plasma cells containing γ A-immunoglobulin. *Lab. Invest.*, 14: 235-48, 1965.
 - 55) 浜島義博, 陳 世沢: Immunoglobulin 母地, 最新医学, 23: 1566-77, 1968.
 - 56) Chen, S. T.: Cellular sites of immunoglobulins. II. The relative proportions of mucosal cells containing IgG, IgA, and IgM, and light polypeptide chains of Kappa and lambda immunoglobulin in human appendices. *Acta Path. Jap.*, 21: 67-83, 1971.
 - 57) Søltoft, J. and Sjøberg, B.: Immunoglobulin-containing cells in the small intestine during acute enteritis. *Gut*, 13: 535-38, 1972.
 - 58) Tomasi, T. B.: The gamma A immunoglobulins, first line of defence. *Hpsp. Pract.*, 2: 26-35, 1967.
 - 59) Porter, P., Noakes, D.E. and Allen, W.D.: Intestinal secretion of immunoglobulins and antibodies to *Escherichia coli* in the pig. *Immunology*, 18: 909-920, 1970.
 - 60) 児玉 宏, 磯辺善成, 正木直也, 戸部隆吉, 浜田忠弥: アデノウイルス抗体産生の研究 I. 螢光標識アデノウイルス抗原静注マウスの観察 (未発表).
 - 61) Potter, C. W. and Shedden, W.I.H.: The distribution of adenovirus antibodies in normal children. *J. Hyg. (Camb.)*, 61: 155-160, 1963.
 - 62) Raff, M. C., Sternberg, M. and Taylor, R. B.: Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells. *Nature*, 225: 553, 1970.
 - 63) Pernis, B., Forni, L. and Amante, L.: Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 132: 1001-17, 1970.
 - 64) Taylor, R. B., Duffus, P. H., Raff, M. C. and de Petris, S.: Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nature New Biol.*, 233: 225-229, 1971.
 - 65) Paraskevas, F., Orr, K. B. and Lee, S. T.: Cell surface-associated gamma globulins in lymphocytes. III. Changes of γ -globulin-carrying lymphocytes during primary response. *J. Immunol.*, 109: 1254-61, 1972.
 - 66) Wilson, J. D., Nossal, G. J. V. and Lewis, H.: Metabolic characteristics of lymphocyte surface immunoglobulins. *Eur. J. Immunol.*, 2: 225-32, 1972.
 - 67) 正木直也, 磯辺善成, 武田温雄, 児玉 宏: 腸管における免疫グロブリンの分布, 通信医学, (印刷中).
 - 68) Gelzayd, E. A., Kraft, S. C., Fitch, F. W. and Kirsner, J. B.: Distribution of immunoglobulins in human rectal mucosa. II. Ulcerative colitis and abnormal mucosal control subjects. *Gastroenterology*, 54: 341-347, 1968.
 - 69) 児玉 宏, 正木直也, 磯辺善成, 小川博輝, 大垣和久, 戸部隆吉, 日笠頼則, 陳 世沢: 非特異性限局性腸炎の免疫組織学的検討, 第2回臨床免疫学会総会, 京都, 1974.
 - 70) Tobe, T., Kodama, H., Masaki, N. and Hamada, C.: Adenovirus antibody producing immunoglobulin in the human intestine. 第9回国際消化器病学会, パリ, 1972.
 - 71) Kodama, H., Masaki, N., Tobe, T., Chen, S. T. and Hamada, C.: Fluorescent antigen technique; Localization of specific antibody in adenovirus infected tissues. 第4回国際組織細胞化学学会, 京都, 1972. (Abstr.-Histochemistry and Cytochemistry 1972, p. 461)
 - 72) 正木直也: 消化器外科領域におけるアデノウイルス感染症の研究——虫垂炎ならびに小児腸重積症の検討, 日本外科宝庫 (印刷中).